

Е. В. Никитина, З. В. Галимова, Н. Н. Абдуллина,
Ф. К. Алимова

ВЛИЯНИЕ ОБРАБОТКИ АМИЛАЗОЙ *BACILLUS LICHENIFORMIS* НА МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПШЕНИЧНОГО КРАХМАЛА

Ключевые слова: пшеничный модифицированный крахмал, амилаза Bacillus licheniformis, физико-химические свойства, световая микроскопия.

Морфологический анализ пшеничных крахмалов, полученных после ферментации амилазой Bacillus licheniformis при варьировании времени выявил уменьшение размера гранул крахмала с увеличением времени ферментации. В результате обработки снижалась вязкость и уменьшалось количество амилозы. Было выявлено повышение эмульгирующей способности крахмалов, особенно у образца, прошедшего четырехчасовую ферментную обработку.

Keywords: wheat modified starch, amylase Bacillus licheniformis, physical and chemical properties, light microscopy.

Morphological analysis of wheat starches obtained after the fermentation of Bacillus licheniformis amylase by varying the time revealed a reduction in the size of the starch granules with increasing fermented time. The amylase treatment leads to reduces of the viscosity and decreased the number of amylose. It was revealed increased emulsifying ability of starches, especially in the sample held four-enzymatic treatment.

Введение

В настоящее время в пищевой промышленности крахмал активно используется как пищевая добавка, обладающая немалым количеством свойств, с помощью которых можно улучшить качество продукта. Крахмал, из-за своих физико-химических свойств, в значительной степени влияет на текстуру пищевого продукта, его часто применяют как загуститель, стабилизатор, наполнитель и компонент, хорошо удерживающий влагу [1,2].

В промышленности используется крахмалы различного происхождения, в зависимости от цели их применения. Свойства крахмала главным образом зависят от физических и химических характеристик среднего размера гранул, процентное распределение различных размерных групп гранул, отношение амилоза/амилопектин и минеральное содержание [2,3]. Различные крахмалы отличаются морфологической структурой гранул, вследствие чего они обладают различными химическими и физическими свойствами. Морфологические свойства крахмала различного растительного происхождения варьируются в зависимости от генотипа. Изменения размеров и формы крахмальных зерен объясняются биологическим происхождением. Морфология крахмальных гранул зависит от биохимии хлоропластов, а также от физиологии растений [4,5].

Для промышленного производства крахмала большое значение имеет морфологические особенности крахмальных зерен перерабатываемого крахмалосодержащего сырья. Форма и размеры крахмальных зерен существенно влияют на выбор способа извлечения крахмала из растительного сырья.

Для изучения морфологических свойств крахмала применяются такие методы как микроскопия, спектроскопия, дифференциальное сканирование калориметрии и т. д. [6,7].

С целью улучшения физико-химических свойств крахмалов и расширения спектров его промышленного применения, его подвергают частичной ферментации. О перспективности применения амило-

литических ферментов в пищевой промышленности говорят многие авторы [Maarel 2002, You, M.S. Izydorczyk, 2007]. Амилазы делят на 2 типа: экзо- и эндоамилазы. Эндоамилазы гидролизуют внутренние связи крахмальных молекул, при этом образуются линейные и разветвленные полисахариды с различной длиной цепи. Экзоамилазы гидролизуют по невозстанавливающему конечному фрагменту цепи, в результате чего образуются короткие конечные продукты гидролиза. В результате ферментации изменяются физико-химические и морфологические свойства нативных крахмалов [11].

В связи с вышесказанным целью данной работы было охарактеризовать изменения ряда физико-химических свойств и морфологии крахмальных клейстеров в результате модификации амилолитическим ферментом бактериального происхождения.

Материалы и методы исследования

В качестве объекта исследования выступали пшеничные крахмалы: нативный (ГОСТ Р 53501-2009) и ферментированные амилазой *Bacillus licheniformis*. Ферментацию проводили в течение от 1 до 4 часов, в зависимости от продолжительности ферментации биомодифицированные крахмалы были названы: BI-1, BI-2, BI-3 и BI-4, время ферментации 1, 2, 3 и 4 часа, соответственно.

Модификацию осуществляли в дистиллированной воде при pH=7,5. Концентрация крахмала в реакционной смеси 30 г/100 мл. Активность используемой амилазы в реакционной смеси была 8,3 У/г крахмала (для этого добавляли 1 мл к. ж. *Bacillus licheniformis*/100 мл реакционной смеси).

Реакцию гидролиза останавливали путем добавления концентрированной серной кислоты до pH=2. Затем крахмал отделяли от жидкости фильтрованием и высушивали при 40°C. Для дальнейших исследований готовили клейстеры крахмалов в концентрации 1% с предварительным завариванием и выдерживанием при 90°C, 5 мин.

Определение вязкости крахмалов. В коническую колбу отобраны 20 мл дистиллированной воды, в части воды (5 мл) развели крахмал массой 0,2 г, а затем оставшиеся 15 мл довели до кипения. Разведенный крахмал осторожно влили в кипяток. После чего смесь остужается до комнатной температуры. Отобрали 5 мл каждого образца крахмального клейстера и измерили массу на аналитических весах, затем на вискозиметре замеряли время истечения крахмального клейстера. Расчет производили по общепринятой формуле.

Определение амилозы. Реактивы: А – КJ – 20 г и 2 г J2 растворяют в 100 мл дистиллированной воды (сначала растворяют в минимальном количестве этилового спирта). В – 10 мл раствора А разводят водой до 100 мл в мерной колбе (то есть в 10 раз).

Для определения содержания амилозы 20 мг крахмала смешивают с 10 мл 0,5 Н КОН (28,055 г/л) в мерной колбе и перемешивают на магнитной мешалке 5 мин, затем доводят до 100 мл дистиллированной водой. От этого объема отбирают 10 мл и смешивают с 5 мл 1Н HCl (8,17 мл концентрированной HCl доведенный до 100 мл) и 0,5 мл йодного раствора В и доводят дистиллированной водой до 50 мл. В течение 5 минут измеряют при 625 нм.

Расчет процентного количества амилозы вычисляем по формуле:

$$Y = 85,24 * X - 13,19,$$

где X – это величина поглощения при 625 нм [15].

Определение эмульгирующей активности. Для определения эмульгирующей активности смешивали 0,5 мл подсолнечного масла, 1,5 мл исследуемого образца 1% крахмального клейстера и встряхивали на шейкере 2 минуты. После этого берут 0,5 мл перемешанной эмульсии со дна и смешивают с 4,5 раствором 0,1% SDS (додецил сульфат натрия), проводят измерением при 500 нм [14].

Для микроскопирования использовали предварительно выдержанные при 60 °С в течение 10 мин 5% растворы крахмалов, которые окрашивали раствором Люголя (I2/KI раствор; 1:2 w/w). Немедленно просматривали под световым микроскопом Axio Imager в комплекте с видео камерой. Для просмотра использовали увеличение в 400 раз.

Результаты исследований и обсуждение

Исследование физико-химических характеристик крахмальных клейстеров ферментированных полисахаридов выявило снижение их вязкости по сравнению с нативным (табл.1). Причем, наибольшее снижение вязкости наблюдалось уже после одночасовой экспозиции фермента с крахмальным раствором. Увеличение времени обработки приводило к дальнейшему монотонному снижению этого показателя, но уже с меньшей скоростью.

Эмульгирующая же активность у исследуемых образцов ферментированных крахмалов также снижалась, по сравнению с нативным. Однако у крахмалов, прошедших одно- и двухчасовую ферментную обработку, наблюдалось уменьшение эмульгирующей активности, а дальнейшая ферментная обработка приводила к существенному увеличению этого показателя (табл. 1). Наибольшее значение эмульгирующей ак-

тивности среди ферментированных образцов выявлено у четырехчасового образца.

Таблица 1 - Влияние ферментной обработки на вязкость, эмульгирующую активность и количество амилозы пшеничных крахмалов

Вид крахма- ла	Вяз- кость, Т	Эмульгирующая активность, D, l=500 нм	Содержание амилозы, %
Нативный	2,846	0,266	9,48 ±1,13
Bl-1	1,683	0,256	5,64±0,39
Bl-2	1,591	0,233	4,78±0,41
Bl-3	1,471	0,258	3,54±1,00
Bl-4	1,339	0,252	4,02±0,37

Морфологические исследования ферментированных крахмалов представлены в микрофотографиях, где наглядно изображено существенное отличие в размерах и геометрии гранул (рис. 1).

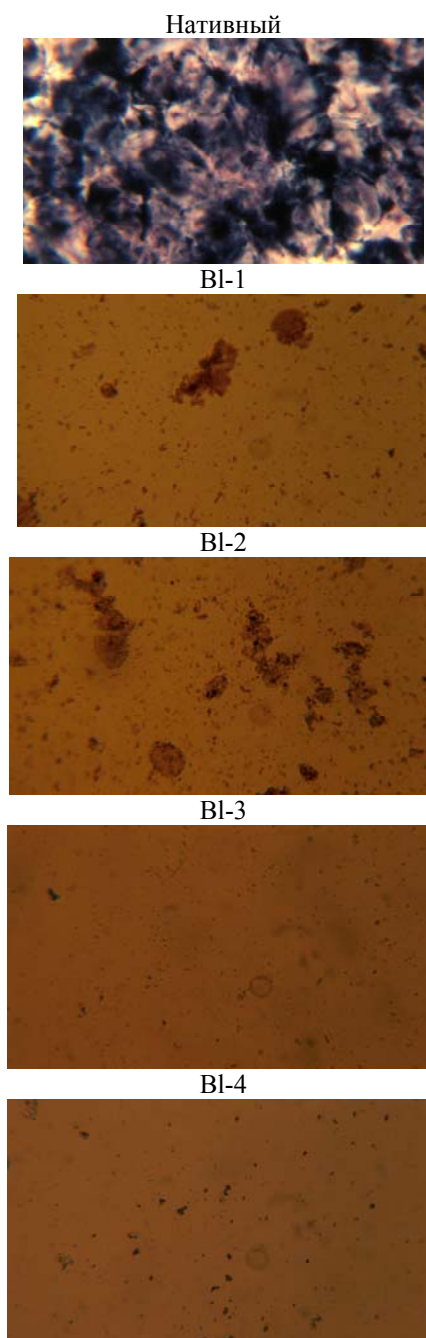


Рис. 1 - Морфологические свойства нативного и ферментированных пшеничных крахмалов

В случае нативного крахмала выявлено сильное разбухание гранул крахмала. Гранулы же ферментированных крахмалов по мере увеличения продолжительности ферментации существенно уменьшались в размерах, образуя при этом слипание в конгломераты. Однако у образцов, прошедших трех- и четырехчасовую ферментную обработку, структуры гранул практически полностью разрушились, и наблюдались лишь отдельные мельчайшие частицы гранул.

Микроскопические исследования выявили увеличение дисперсности гранул крахмала, с увеличением времени модификации. Гранулы изученных крахмалов были округлой, неправильной формы, с нарушенной структурой. Воздействие фермента на крахмал с морфологической точки зрения привело кроме уменьшения размера частицы гранул, еще и к снижению образования конгломератов между зернами.

Выше нами показано, резкое снижение доли амилозы при одно- и двухчасовом действии фермента на крахмал, видимо, связано с особенностью действия фермента *Bacillus licheniformis*, которая состоит в его приоритетном расщеплении молекулы амилозы. Дальнейшая периодичность снижения и возрастания процентного содержания амилозы и амилопектина может быть связана с чередованием слоев аморфной и полукристаллической зон, соответственно последовательным их расщеплением [8,9].

В результате проведенных экспериментов следует отметить, что является перспективным применение крахмала, обработанного амилазой *B.licheniformis* в течении одного часа, в технологии продуктов, требующих создания и стабилизации водно-жиро-белковой эмульсии. В качестве таких продуктов можно рассматривать молочные, кисломолочные напитки и средне- и маложирные соусы типа майонез. В свою

очередь образец, прошедший четырехчасовую ферментную обработку может применяться для создания наиболее стойких белково-жировых эмульсий.

Литература

1. N. Singh et al., Food Chemistry, 81, 219–231, (2003).
2. D. Li, Y. Ma, African J. of Biotechnology, 10, 17, 3430–3435 (2011).
3. Tester & Morrison, N. Singh, Food Chemistry, 81 219–231, (2003).
4. B. Zhang, X. Li, J. Liu, F. Xie, L. Chen, Food Hydrocolloids, 31, 68–73, (2013).
5. M. Karaoglu, H. G. Kotancilar, I Celik. Starch, 53, 162–169, (2001).
6. M. Kaur, D. P. S. Oberoi, D. S. Sogi, B. S. Gill. J Food Sci Technol, 48, 460–465, (2011).
7. M. J. E. C. van der Maarel, I. Caprona, G.-J. W. Euverinka, H. Th. Bosa, T. Kaper, D. J. Binnema, P. A.M. Steeneken, Starch, 57, 465–472 (2005).
8. M.H. Madsen, D. H. Christensen, Starch, 48, 245–249 (1996).
9. J.-H. Auh, H. Y. Chae, Y.-R. Kim, K.-H. Shim, S.-H. Yoo, K.-H. Park, J. Agric. Food Chem, 54, 2314–2319 (2006).
10. B. A Henrissat, Biochem. J. 280, 309–316 (1991).
11. Е.В. Никитина, Л.З. Габдукаева. Вестник Казанского технологического университета, 19, 154–161 (2011).
12. M. J.E.C. van der Maarel, B. van der Veen a,d, J.C.M. Uitdehaag, H. Leemhuis, L. Dijkhuizen, Journal of Biotechnology, 94, 137–155 (2002).
13. S. You, M.S. Izydorczyk, Carbohydrate Polymers 69 489–502, (2007).
14. A. Kato, K. Minaki, K. Kobayashi, J. Agric. Chem, 41, 540–543 (1993).
15. Williams PC, Kuzina FD and Hlynka I, A. Cereal Chem 47, 411–420 (1970).

© **Е. В. Никитина** – к.б.н., доц. каф. технологии пищевых производств КНИТУ, НОЦ «Фармацевтика» К(П)ФУ, ev-nikitina@inbox.ru; **З. В. Галимова** – студ. КНИТУ; **Н. Н. Абдуллина** – студ. КНИТУ; **Ф. К. Алимова** – д.б.н., проф., зав. кафедры биохимии К(П)ФУ.